



# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Bresilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Verfahren zur Veränderung, Abbau oder Bleichen von Lignin, ligninhaltigen Materialien oder ähnlichen Stoffen.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein neuartiges Verfahren zur Veränderung von ligninhaltigen Materialien oder ähnlichen Stoffen mittels Oxidationskatalysatoren und hocheffektiven Mediatoren.

Wirtschaftlich am bedeutensten ist die Entfernung von Lignin bei der Herstellung von Zellstoff.

Als heute hauptsächlich zur Zellstoffherstellung verwendete Verfahren sind das Sulfat- und das Sulfitverfahren zu nennen. Mit beiden Verfahren wird unter Kochen und unter Druck Zellstoff erzeugt. Das Sulfat-Verfahren arbeitet unter Zusatz von NaOH und  $\text{Na}_2\text{S}$ , während im Sulfit-Verfahren  $\text{Ca}(\text{HSO}_3)_2 + \text{SO}_2$  zur Anwendung kommt.

Daneben existieren einige umweltfreundliche Kochverfahren mit Hilfe von organischen Lösungsmitteln.

Alle Verfahren haben als Hauptziel die Entfernung des Lignins aus dem verwendeten Pflanzenmaterial, Holz oder Einjahrespflanzen.

Das Lignin, das mit der Cellulose und der Hemicellulose den Hauptbestandteil des Pflanzenmaterials (Stengel oder Stamm) ausmacht, muß entfernt werden, da es sonst nicht möglich ist, nicht vergilbende und mechanisch hochbelastbare Papiere herzustellen.

Die Holzstofferzeugungsverfahren arbeiten mit Steinschleifern (Holzschliff) oder mit Refinern (TMP), die das Holz nach entsprechender Vorbehandlung (chemisch, thermisch oder chemisch-thermisch) durch Mahlen defibrillieren.

Diese Holzstoffe besitzen noch einen Großteil des Lignins. Sie werden u.a. für die Herstellung von Zeitungen, Illustrierten, etc. verwendet.

Seit einigen Jahren werden die Möglichkeiten des Einsatzes von Enzymen für den Ligninabbau erforscht. Der Wirkmechanismus derartiger lignolytischer Systeme ist erst vor einigen Jahren aufgeklärt worden, als es gelang, durch geeignete Anzuchtbedingungen und Induktorzusätze bei dem Weißfäulepilz *Phanerochaete chrysosporium* zu ausreichenden Enzymmengen zu kommen. Hierbei wurden die bis dahin unbekannten Ligninperoxidasen und Manganperoxidasen entdeckt. Da *Phanerochaete chrysosporium* ein sehr effektiver Ligninabbauer ist, versuchte man dessen Enzyme zu isolieren und in gereinigter Form für den Ligninabbau zu verwenden. Dies gelang jedoch nicht, da sich herausstellte, daß die Enzyme vor allem zu einer Repolymerisation des Lignins und nicht zu dessen Abbau führen.

Ähnliches gilt auch für andere lignolytische Enzymspezies wie Laccasen, die das Lignin mit Hilfe von Sauerstoff anstelle von Wasserstoffperoxid oxidativ abbauen. Es konnte festgestellt werden, daß es in allen Fällen zu ähnlichen Prozessen kommt. Es werden nämlich Radikale gebildet, die wieder selbst miteinander reagieren und somit zur Polymerisation führen.

So gibt es heute nur Verfahren, die mit in-vivo Systemen

arbeiten (Pilzsystemen), Hauptschwerpunkte von Optimierungsversuchen sind das sogenannte Biopulping und das Biobleaching.

Unter Biopulping versteht man die Behandlung von Holzhackschnitzeln mit lebenden Pilzsystemen.

Es gibt 2 Arten von Applikationsformen:

1) Vorbehandlung von Hackschnitzeln vor dem Refinern oder Mahlen zum Einsparen von Energie bei der Herstellung von Holzstoffen (z.B. TMP oder Holzschliff).

Ein weiterer Vorteil ist die meist vorhandene Verbesserung der mechanischen Eigenschaften des Stoffes. ein Nachteil die schlechtere Endweiße.

2) Vorbehandlung von Hackschnitzeln (Softwood/Hardwood) vor der Zellstoffkochung (Kraftprozeß, Sulfitprozeß).

Hier ist das Ziel die Reduzierung von Kochchemikalien, die Verbesserung der Kochkapazität und "extended cooking".

Als Vorteile werden auch eine verbesserte Kappareduzierung nach dem Kochen im Vergleich zu einem Kochen ohne Vorbehandlung erreicht.

Nachteile dieser Verfahren sind eindeutig die langen Behandlungszeiten (mehrere Wochen) und v.a. die nicht gelöste Kontaminierungsgefahr während der Behandlung, wenn man auf die wohl unwirtschaftliche Sterilisation der Hackschnitzel verzichten will.

Das Biobleaching arbeitet ebenfalls mit in-vivo Systemen. Der gekochte Zellstoff (Softwood/Hardwood) wird vor der Bleiche mit Pilz beimpft und für Tage bis Wochen behandelt. Nur nach dieser langen Behandlungszeit zeigt sich eine signifikante Kappzahlerniedrigung und Weißesteigerung, was den Prozeß unwirtschaftlich für eine Implementierung in den gängigen Bleichsequenzen macht.

Eine weitere meist mit immobilisierten Pilzsystemen durchgeführte Applikation ist die Behandlung von Zellstofffabrikationsabwässern, insbesondere Bleichereiabwässer zu deren Entfärbung und Reduzierung des AOX (Reduzierung von chlorierten Verbindungen im Abwasser, die Chlor- oder Chlordioxid-Bleichstufen verursachen).

Darüberhinaus ist bekannt, Hemicellulasen u.a. Xylanasen, Mannanasen als "Bleichboster" einzusetzen.

Diese Enzyme sollen hauptsächlich gegen das nach dem Kochprozeß das Restlignin zum Teil überdeckende reprecipitierte Xylan wirken und durch dessen Abbau die Zugänglichkeit des Lignins für die in den nachfolgenden Bleichsequenzen angewendeten Bleichchemikalien (v.a. Chlordioxyd) erhöhen. Die im Labor nachgewiesenen Einsparungen von Bleichchemikalien wurden in großem Maßstab nur bedingt bestätigt, sodaß man diesen Enzymtyp allenfalls als Bleichadditiv einstufen kann.

Ein weiterer, in letzter Zeit untersuchter möglicher Einsatz von lignolytischen Enzymen oder Pilzen wurde bei der "Kohleverflüssigung" erkennbar. Vorläufige Untersuchungen zeigen die prinzipielle Möglichkeit, Braun-oder-Steinkohle mit Hilfe von -in vivo- Behandlung von z.B. Weißfäulepilzen wie *Phanerochaete chrysosporium* anzugreifen und zu verflüssigen (Inkubationszeit mehrere Wochen). (Bioengineering 4.92. 8 Jg.)

Die mögliche Struktur von Steinkohle zeigt ein dreidimensionales Netzwerk von polycyclischen aromatischen Ringsystemen mit einer "gewissen" Ähnlichkeit zu Ligninstrukturen.

Als Cofaktoren neben den lignolytischen Enzymen nimmt man Chelatsubstanzen (Siderophoren, wie Ammoniumoxalat) und Biotenside an.

In der Anmeldung PCT/EP87/00635 wird ein System zur Entfernung von Lignin aus lignincellulosehaltigem Material unter

gleichzeitiger Bleiche beschrieben, welches mit lignolytischen Enzymen aus Weißfäulepilzen unter Zusatz von Reduktions- und Oxidationsmitteln und phenolischen Verbindungen als Mediatoren arbeitet.

In der DE 4008893C2 werden zusätzlich zum Red/Ox-System "Mimic Substanzen", die das aktive Zentrum (prothetische Gruppe) von lignolytischen Enzymen simulieren, zugesetzt. So konnte eine erhebliche Performanceverbesserung erzielt werden.

In der Anmeldung PCT/EP92/01086 wird als zusätzliche Verbesserung eine Redoxkaskade mit Hilfe von im Oxidationspotential "abgestimmten" phenolischen oder nichtphenolischen Aromaten eingesetzt.

Bei allen drei Verfahren ist die Limitierung für einen großtechnischen Einsatz die Anwendbarkeit bei geringen Stoffdichten (bis maximal 4%) und bei den beiden letzten Anmeldungen die Gefahr des "Ausleachens" von Metallen beim Einsatz der Chelatverbindungen, die bei v.a. nachgeschalteten Peroxidbleichstufen zum Zerstören des Peroxids führen könnten.

Die vorliegende Erfindung hat sich nunmehr die Aufgabe gestellt, ein Verfahren zur Veränderung, Abbau oder Bleiche von Lignin, ligninhaltigem Material oder ähnlichen Stoffen unter Einsatz von Oxidationskatalysatoren und geeigneten Oxidationsmitteln zur Verfügung zu stellen, das eine wesentlich bessere Effizienz als die bisher bekannten Verfahren aufweist.

Diese Aufgabe wird dadurch gelöst, daß die Katalysatoren in Kombination mit aliphatischen, cycloaliphatischen, heterocyclischen oder aromatischen NO-, NOH- oder ~~H-N~~-OH-haltigen Verbindungen eingesetzt werden.

Erfindungsgemäß werden als aliphatische, cycloaliphatische, heterocyclische oder aromatische NO-, NOH- oder ~~H-N~~-OH-haltige Ver-

bindungen N-Hydroxy, Oxim-, N-Oxid und N-Dioxid-Verbindungen, Hydroxylamin, Hydroxylamin-Derivate, Hydroxamsäuren oder Hydroxamsäurederivate in Ein- oder Mehrkomponentensystemen eingesetzt. Die genannten Verbindungen können in Kombination mit phenolischen Verbindungen und/oder nicht-phenolischen Verbindungen mit einem oder mehreren Benzolkernen und/oder Aromaten verwendet werden.

Als Katalysatoren kommen erfindungsgemäß vor allem Enzyme zum Einsatz. Bevorzugt werden hier wiederum die Oxidoreduktasen. Hierzu zählen insbesondere Oxidasen, Peroxidasen, Ligninperoxidasen, Manganperoxidasen und Laccasen.

Zum Einsatz kommen vorzugsweise solche Enzyme, die aus Pilzen, Bakterien, Pflanzen und Tieren gewonnen worden sind. Ganz besonders bevorzugt werden erfindungsgemäß Enzyme, die aus Weißfäulepilzen isoliert sind. Hierzu zählt vor allem *Coriolus versicolor*.

Demzufolge werden bei der Delignifizierung von Sulfat-, Sulfit-, Organozell-, OCC- Einjahrespflanzenzellstoffen, Kohleverflüssigungen oder der Bleiche von Holzstoffen ganz besonders die Laccasen verwendet, die aus Weißfäulepilzen, insbesondere *Coriolus versicolor* gewonnen worden sind.

Grundsätzlich können sowohl natürlich vorkommende als auch gentechnisch veränderte Organismen Enzymproduzenten sein. Ebenso sind Teile von einzelligen oder mehrzelligen Organismen als Enzymproduzenten denkbar, vor allem Zellkulturen. Darüber hinaus kommen für die Zwecke der Erfindung z. B. modifizierte Enzyme, Enzymbestandteile und prostetische Gruppen in Betracht.

Zusätzlich zu den genannten Enzymen können noch Hemicellulasen, Cellulasen, Pektinasen, Amylasen und Lipasen der Reaktionslösung zugegeben werden. Hier kann ebenfalls ein Gemisch von zwei oder mehr Enzymen als Katalysator dienen. Unter Umständen können hierbei Synergieeffekte bei der Entfernung des Lignins auftreten.



Dank des Einsatzes der oben genannten Enzyme in Kombination mit den erwähnten aliphatischen, cycloaliphatischen, heterocyclischen oder aromatischen NO-, NOH- oder NHOH-haltigen Verbindungen - im folgenden als Mediatoren bezeichnet - konnte beispielsweise bei der Bleiche von Sulfatzellstoffen das völlig überraschende Ergebnis einer Reduzierung der Kappazahl von 30 auf 10 innerhalb von 1 bis 4 Stunden selbst bei einer hohen Konsistenz im Bereich von 4 bis 20% erzielt werden.

In einer weiteren Variante der Erfindung können die genannten Stoffe in Kombination mit phenolischen Verbindungen oder nicht-phenolischen organischen Verbindungen mit einem oder mehreren Benzolkernen oder Aromaten verwendet werden.

Gleichzeitig können Reduktions- und Oxidationsmittel zur Einstellung eines bestimmten Red/Ox-Potentials zugesetzt werden.

Als Reduktionsmittel können Natrium-Bisulfit, Natrium-Dithionit, Ascorbinsäure, Thiolverbindungen, Mercaptoverbindungen oder Gluthation eingesetzt werden.

Als Oxidationsmittel können Luft, Sauerstoff, Ozon,  $H_2O_2$  oder organische Peroxide in Betracht kommen.

Die Reaktion läuft beispielsweise bei Laccase unter Sauerstoffzufuhr oder Sauerstoffüberdruck ab, bei den Peroxidasen (z.B. Ligninperoxidase, Manganperoxidase) mit Wasserstoffperoxid. Dabei können beispielsweise der Sauerstoff auch durch Wasserstoffperoxid + Katalase und Wasserstoffperoxid durch Glucose + GOD oder andere Systeme in situ generiert werden.

Außerdem können dem System Radikalbildner oder Radikalfänger (Abfangen von beispielsweise  $OH\cdot$  - oder  $OOH\cdot$  -Radikalen) zugesetzt werden. Diese können das Zusammenspiel innerhalb der Red/Ox- und Radikalmediatoren verbessern.

Der Reaktionslösung können auch Metallsalze zugegeben werden.

Diese sind im Zusammenwirken mit Chelatbildnern als Radikalbildner oder Red/Ox-Zentren wichtig. Die Salze bilden in der Reaktionslösung Kationen. Solche Ionen sind u.a.  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{4+}$ ,  $\text{Cu}^{+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ti}^{3+}$ ,  $\text{Ce}^{4+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ .

Die in der Lösung vorhandenen Chelate können darüberhinaus als Mimicsubstanzen für die Enzyme, beispielsweise für die Laccasen, (Kupferkomplexe) oder für die Lignin- oder Manganperoxidasen (Hämkomplexe) dienen. Unter Mimicsubstanzen sind solche Stoffe zu verstehen, die die prosthetischen Gruppen von (hier) Oxidoreduktasen simulieren und z.B. Oxidationsreaktionen katalysieren können.

In einer weiteren Variante der Erfindung werden daher der Reaktionslösung auch Komplexbildner zugegeben. Als besonders wirksam hat sich hierbei der Einsatz der Komplexe bildenden Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) oder Diethylentriamin-pentaessigsäure (DTPA) erwiesen. Ebenso sind an dieser Stelle andere Eisen-, Mangan- oder Kupfer-Komplexoren zu nennen, z. B. Diethylamin, Hydroxylamin.

Weiterhin kann dem Reaktionsgemisch NaOCl zugesetzt werden. Diese Verbindung kann im Zusammenspiel mit Wasserstoffperoxid Singulett-Sauerstoff bilden.

Schließlich ist es auch möglich, unter Einsatz von Detergentien zu arbeiten. Als solche kommen nicht-ionische, anionische, kationische und amphotere Tenside in Betracht. Die Detergentien können die Penetration der Enzyme und Mediatoren in die Faser verbessern.

Ebenso kann es für die Reaktion förderlich sein, Polysaccharide und / oder Proteine zuzusetzen. Hier sind insbesondere als Polysaccharide Glucane, Mannane, Dextrane, Lävane, Pektine, Alginate oder Pflanzengummi und/oder eigene von den Pilzen gebildete oder in der Mischkultur mit Hefen produzierte Polysaccharide und als Proteine Gelatine und Albumin zu nennen.

Diese Stoffe dienen hauptsächlich als Schutzkolloide für die Enzyme.

Weitere Proteine, die zugesetzt werden können, sind Proteasen wie Pepsin, Bromelin, Papain usw.. Diese können u.a. dazu dienen, durch den Abbau des im Holz vorhandenen Extensins (hydroxypholinreiches Protein) einen besseren Zugang zum Lignin zu erreichen.

Als weitere Schutzkolloide kommen Aminosäuren, Einfachzucker, Oligomierzucker, Aminosäuren, PEG-Typen der verschiedensten Molekulargewichte, Polyethylenoxide, Polyethylenimine und Polydimethylsiloxane in Frage.

Das erfindungsgemäße Verfahren arbeitet im Temperaturbereich zwischen 25 und 80°C, vorzugsweise bei 40 bis 60°C in Gegenwart von Sauerstoff oder Luft wird bei Normaldruck bis zu 10 bar Überdruck gearbeitet. Der Konsistenzbereich der Reaktionslösung liegt bei 0,5 bis 40%.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann nicht nur bei der Delignifizierung (Bleiche) von Sulfat-, Sulfit-, Organosolv- o. a. Zellstoffen und von Holzstoffen eingesetzt werden, sondern auch bei der Herstellung von Zellstoffen allgemein, sei es aus Holz oder Einjahrespflanzen, wenn eine Defibrillierung durch die üblichen Kochverfahren (verbunden eventuell mit mechanischen Verfahren oder Druck), d.h. eine sehr schonende Kochung bis zu Kappazahlen, die im Bereich von ca. 50-120 Kappa liegen können, gewährleistet ist.

Bei der Bleiche von Zellstoffen wie auch bei der Herstellung von Zellstoffen kann die Behandlung mehrfach wiederholt werden, entweder nach Wäsche und Extraktion des behandelten Stoffes mit NaOH oder ohne diese Zwischenschritte. Dies führt zu noch wesentlich weiter reduzierten Kappawerten und zu erheblichen Weißsteigerungen. Ebenso kann vor der Enzym/Mediatorbehandlung eine O<sub>2</sub> Stufe eingesetzt werden oder auch eine saure Wäsche oder

Q-Stufe (Chelatstufe) ausgeführt werden.

Bei der "Verflüssigung" von Kohle (Steinkohle, Braunkohle) wird eine ähnliche Verfahrensführung wie bei der Delignifizierung (Bleiche) von Holz oder Einjahrespflanzenzellstoff eingesetzt.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen näher erläutert:

#### Beispiel 1

Beispiel: Enzymatische Bleiche und Sulfatzellstoff.

30 g atro Zellstoff (Softwood), Stoffdichte 30% (- 100 g feucht) werden zu folgenden Lösungen gegeben:

1) 120 ml Leitungswasser werden mit 600 mg Mediatorverbindungen 1-10 jeweils in getrennten Ansätzen unter Rühren versetzt, der pH Wert mit 0.5 m  $H_2SO_4$  so eingestellt, daß nach Zugabe des Zellstoffes und des Enzyms pH 4,5 resultiert. Dazu werden 20000 IU (IU=Umsatz von 1µM Syringaldazin/min/ml Enzym) Laccase von *Coriolus versicolor* pro g Stoff gegeben. Die Lösung wird auf 200 ml aufgefüllt und der Stoff zugegeben. Es wird für 2 min mit einem Teigknetter gemixt.

Danach wird der Stoff in eine auf 45 °C vorgeheizte Reaktionsbombe gegeben und unter 1 - 10 bar Überdruck für 1-4 Stunden inkubiert.

Danach wird der Stoff über einem Nylonsieb (30µm) gewaschen und 1 Std. bei 60°C, 8% Stoffdichte und 2% NaOH pro g Stoff extrahiert.

Nach erneuter Wäsche des Stoffes wird die Kappazahl bestimmt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1

Mediator	Kappa (Zellstoff) vor Behandlung	Kappa (Zellstoff) nach Behandlung
1	28,7	22
2	28,7	19,2
3	28,7	22,3
4	28,7	21,8
5	28,7	21,4
6	28,7	22
7	28,7	19,9
8	28,7	21,5
9	28,7	10
10	28,7	21,7

## Verbindungen 1 N,N-Dibenzylhydroxylamin

- 2 Hydroxybenzimidazol
- 3 Hydroxypiperidin
- 4 Chinolinoxid
- 5 Isochinolinoxid
- 6 Hydroxypyrolidin
- 7 Hydroxyhexahydroazepin
- 8 8-(N-Oxy 1,2,3,4 Tetrahydro)isochinolinoperpion-  
säure
- 9 Hydroxybenzotriazol
- 10 2,6 Dimethyl 2,6 Dihydroxyl aminoheptan 4-on -Oxa-  
lat

## Beispiel 2

Beispiel: Enzymatische Bleiche und Sulfatzellstoff.

30 g atro Zellstoff (Softwood O<sub>2</sub> delignifiziert), Stoffdichte 30% (-100 g feucht) werden zu folgenden Lösungen gegeben:

1) 120 ml Leitungswasser werden mit 300 mg Hydroxybenzotriazol unter Rühren versetzt, der pH Wert mit 0,5 m H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> so eingestellt, daß nach Zugabe des Zellstoffes und des Enzyms pH 4,5 resultiert. Dazu werden 1000 bzw. 10.000 IU (IU=Umsatz von 1 µM Syringaldazin/min/ml Enzym) Laccase von Coriolus versicolor pro g Stoff gegeben, 1000 IU Ligninperoxidase/g Stoff, 1000 IU Peroxidase (Meerrettich)/g Stoff, 1000 IU Tyrosinase/g Stoff jeweils in getrennten Ansätzen. Die Lösung wird auf 200 ml aufgefüllt und der Stoff zugegeben. Es wird für 2 min mit einem Teigknetter gemixt.

Danach wird der Stoff in eine auf 45 °C vorgeheizte Reaktionsbombe gegeben und unter 1-10 bar Überdruck für 1-4 Stunden inkubiert.

Danach wird der Stoff über einem Nylonsieb (30µm) gewaschen und 1 Std. bei 60°C, 8% Stoffdichte und 2% NaOH pro g Stoff extrahiert.

Nach erneuter Wäsche des Stoffes wird die Kappazahl bestimmt. (vgl. Tabelle 2)

Tabelle 2

Enzyme	Kappa (Zellstoff) vor Behandlung	Kappa (Zellstoff) nach Behandlung
Ligninperoxidase	15,2	11,3
Peroxidase (Meer- rettich) 19036 Serva	15,2	11,75
Thyrosinase T-7755 Sigma	15,2	11,35
Laccase 10000 IU	15,2	5,5
Laccase 1000 IU	15,2	10,0

## Beispiel 3

Beispiel: Enzymatische Bleiche und Sulfatzellstoff.

30 g atro Zellstoff (Softwood/Hardwood), Stoffdichte 30% (~100 g feucht) werden zu folgenden Lösungen gegeben:

- 1) 120 ml Leitungswasser werden mit 300 mg Hydroxybenzotriazol unter Rühren versetzt, der pH Wert mit 0,5 m  $H_2SO_4$  so eingestellt, daß nach Zugabe des Zellstoffes und des Enzyms pH 4,5 resultiert. Dazu werden 20000 IU (IU=Umsatz von 1 m Syringaldazin/min/ml Enzym) Laccase von Coriolus versicolor pro g Stoff gegeben. Die Lösung wird auf 200 ml aufgefüllt und der Stoff zugegeben. Es wird für 2 min mit einem Teigkneteter gemixt.

Danach wird der Stoff in eine auf 45 °C vorgeheizte Reaktionsbombe gegeben und unter 1-10 bar Überdruck für 1-4 Stunden inkubiert.

Danach wird der Stoff über einem Nylonsieb (30µm) gewaschen und 1 Std. bei 60°C, 8% Stoffdichte und 2% NaOH pro g Stoff extrahiert.

Nach erneuter Wäsche des Stoffes wird die Kappazahl bestimmt.

Es wurde eine Kappazahlreduzierung von 15 bis 6 bei Hardwood und von 30 bis 15 bei Softwood erzielt.

#### Beispiel 4

Beispiel: Enzymatische Bleiche von Strohzellstoff

30 g atro Strohzellstoff, Stoffdichte 30% (-100 g feucht) werden zu folgenden Lösungen gegeben:

1) 120 ml Leitungswasser werden mit 300 mg Hydroxybenzotriazol unter Rühren versetzt, der pH Wert mit 0,5 m H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> so eingestellt, daß nach Zugabe des Zellstoffes und des Enzyms pH 4,5 resultiert. Dazu werden 20000 IU (IU=Umsatz von 1µM Syringaldazin/min/ml Enzym) Laccase von Coriolus versicolor pro g Stoff gegeben. Die Lösung wird auf 200 ml aufgefüllt und der Stoff zugegeben. Es wird für 2 min mit einem Teigkneteter gemixt.

Danach wird der Stoff in eine auf 45 °C vorgeheizte Reaktionsbombe gegeben und unter 1-10 bar Überdruck für 1-4 Stunden inkubiert.

Danach wird der Stoff über einem Nylonsieb (30µm) gewaschen und 1 Std. bei 60°C, 8% Stoffdichte und 2% NaOH pro g Stoff extrahiert.

Nach erneuter Wäsche des Stoffes wird die Kappazahl bestimmt.



Es wurde eine Kappazahlreduzierung von 65 auf 14 erreicht.

#### Beispiel 5

Beispiel: Enzymatische Bleiche und Sulfitzellstoff.

30 g atro Zellstoff (Sulfitzellstoff), Stoffdichte 30% (-100 g feucht) werden zu folgenden Lösungen gegeben:

1) 120 ml Leitungswasser werden mit 300 mg Hydroxybenzotriazol unter Rühren versetzt, der pH Wert mit 0,5 m  $H_2SO_4$  so eingestellt, daß nach Zugabe des Zellstoffes und des Enzyms pH 4,5 resultiert. Dazu werden 20000 IU (IU=Umsatz von 1µM Syringaldazin/min/ml Enzym) Laccase von Coriolus versicolor pro g Stoff gegeben. Die Lösung wird auf 200 ml aufgefüllt und der Stoff zugegeben. Es wird für 2 min mit einem Teigknetter gemixt.

Danach wird der Stoff in eine auf 45 °C vorgeheizte Reaktionsbombe gegeben und unter 1-10 bar Überdruck für 1-4 Stunden inkubiert.

Danach wird der Stoff über einem Nygonsieb (30µm) gewaschen und 1 Std. bei 60°C, 8% Stoffdichte und 2% NaOH pro g Stoff extrahiert.

Nach erneuter Wäsche des Stoffes wird die Kappazahl bestimmt.

Es wurde eine Kappazahlreduzierung von 15,5 auf 5,2 erreicht.

#### Beispiel 6:

Enzymatische Bleiche von Sulfatzellstoff (Softwood/  $O_2$  delignifiziert/Hardwood (2fache Behandlung)

30 g atro Zellstoff (Hardwood oder Softwood), Stoffdichte 30% (-100 g feucht) werden zu folgenden Lösungen gegeben:

1) 120 ml Leitungswasser werden mit 300 mg Hydroxybenzotriazol unter Rühren versetzt, der pH Wert mit 0,5 m  $H_2SO_4$  so eingestellt, daß nach Zugabe des Zellstoffes und des Enzyms pH 4,5 resultiert. Dazu werden 20000 IU (IU=Umsatz von 1µM Syringaldazin/min/ml Enzym) Laccase von *Coriolus versicolor* pro g Stoff gegeben. Die Lösung wird auf 200 ml aufgefüllt und der Stoff zugegeben. Es wird für 2 min mit einem Teigknetter gemixt.

Danach wird der Stoff in eine auf 45 °C vorgeheizte Reaktionsbombe gegeben und unter 1-10 bar Überdruck für 1-4 Stunden inkubiert.

Danach wird der Stoff über einem Nylonsieb (30µm) gewaschen und 1 Std. bei 60 °C, 8% Stoffdichte und 2% NaOH pro g Stoff extrahiert.

a) Direkt nach der Inkubation wird ohne Waschschrift Enzym + Mediator zugegeben, gemixt (2 min) und die Reaktion erneut durchgeführt (gleiche Zudosierung wie in der ersten Behandlung).

b) Direkt nach der Inkubation wird nach dem Waschschrift und dem Auspressen des Stoffes auf 30% Stoffdichte die Reaktion durch Zuführen aller Komponenten nochmal durchgeführt.

c) Nach erneuter Wäsche des Stoffes. nach Extraktion und Abpressen des Stoffes auf 30% Stoffdichte wird die Reaktion durch Zuführen aller Komponenten nochmals durchgeführt.

Hardwood: Kappazahlensenkung      Softwood: Kappazahlensenkung

- |               |                 |
|---------------|-----------------|
| a) 15 auf 5   | a) 15,5 auf 4,2 |
| b) 15 auf 3,5 | b) 15,5 auf 3   |
| c) 15 auf 2,5 | c) 15,2 auf 2,2 |

#### Beispiel 7

Beispiel: Enzymatische Bleiche von Holzschliff

30 g atro Holzstoff (Fichte). Stoffdichte 30% (-100 g feucht) werden zu folgenden Lösungen gegeben:

1) 120 ml Leitungswasser werden mit 300 mg N-Hydroxyhexahydro-  
acepin unter Rühren versetzt. der pH Wert mit 0.5 m  $H_2SO_4$  so  
eingestellt. daß nach Zugabe des Zellstoffes und des Enzyms pH  
4.5 resultiert. Dazu werden 1000 IU (IU=Umsatz von 1µM  
Syringaldazin/min/ml Enzym) Laccase von Coriolus versicolor pro  
g Stoff gegeben. Die Lösung wird auf 200 ml aufgefüllt und der  
Stoff zugegeben. Es wird für 2 min mit einem Teigknetter gemixt.

Danach wird der Stoff in eine auf 45 °C vorgeheizte Reaktionsbombe  
gegeben und unter 1-10 bar Überdruck für 1-4 Stunden inkubiert.

Danach wird der Stoff über einem Nygonsieb (30µm) gewaschen.

Es konnte eine Weißegradsteigerung von 7% ISO-Weiße erzielt  
werden.

#### Beispiel 8

Beispiel: Enzymatische "Verflüssigung" von Braunkohle

30 g atro gemahlene Braunkohle (-200-500µ Partikelgröße)  
werden zu folgenden Lösungen gegeben:

1) 120 ml Leitungswasser werden mit 600 mg Hydroxybenzotriazol  
unter Rühren versetzt. der pH Wert mit 0.5 m  $H_2SO_4$  so  
eingestellt, daß nach Zugabe der gemahlene Kohle und des  
Enzyms pH 4.5 resultiert. Dazu werden 20000 IU (IU=Umsatz von  
1µM Syringaldazin/min/ml Enzym) Laccase von Coriolus versicolor  
pro g gegeben. Die Lösung wird auf 200 ml aufgefüllt und der  
die Braunkohlezugegeben. Es wird für 2 min gemixt.

Danach wird Lösung in eine auf 45 °C vorgeheizte Reaktionsbombe  
gegeben und unter 1-10 bar Überdruck für 1-4 Stunden inkubiert.  
Der verflüssigte Kohlenstoff wird der Bombe entnommen.

## Patentansprüche:

1. Verfahren zur Veränderung, Abbau oder Bleiche von Lignin, ligninhaltigem Material oder ähnlichen Stoffen unter Einsatz von Oxidationskatalysatoren und geeigneten Oxidationsmitteln, dadurch gekennzeichnet, daß diese Katalysatoren in Kombination mit aliphatischen, cycloaliphatischen, heterocyclischen oder aromatischen NO-, NOH- oder ~~H~~-OH-haltigen Verbindungen eingesetzt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Katalysatoren Oxidoreduktasen eingesetzt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Oxidoreduktasen, Oxydasen, Peroxydasen, Ligninperoxidasen, Manganperoxidasen oder Laccasen eingesetzt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß aus Weißfäulepilzen, anderen Pilzen, Bakterien, Tieren oder Pflanzen stammende Oxidoreduktasen eingesetzt werden, die aus den natürlichen oder genetisch veränderten Organismen gewonnen werden.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß aus *Coriolus versicolor* gewonnene Enzyme eingesetzt werden.
6. Verfahren nach Anspruch 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß der Reaktionslösung Hemicellulasen, Cellulasen, Amylasen, Pektinasen oder Lipasen oder ein aus zwei oder mehreren dieser Enzyme bestehendes Gemisch zugesetzt werden.
7. Verfahren nach Anspruch 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß modifizierte Enzyme, Enzymbestandteile, prosthetische Gruppen oder Mimicsubstanzen wie Hämgruppen und Hämgruppen enthaltende Verbindungen eingesetzt werden.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß als NO-, NOH- oder H-N-OH-haltige aliphatische, cycloaliphatische, heterocyclische oder aromatische Verbindungen N-Hydroxy, Oxim-, N-Oxid und N-Dioxid-Verbindungen, Hydroxylamin, Hydroxylamin-Derivate, Hydroxamsäuren oder Hydroxamsäurederivate in Ein- oder Mehrkomponentensystemen eingesetzt werden.
9. Verfahren nach Anspruch 1-8, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich zu diesen Stoffen phenolische Verbindungen und/oder nicht-phenolische Verbindungen mit einem oder mehreren Benzolkernen eingesetzt werden.
10. Verfahren nach Anspruch 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert zwischen 2 und 9 beträgt, vorzugsweise pH 4-6.
11. Verfahren nach Anspruch 1-10, dadurch gekennzeichnet, daß die Temperatur zwischen 25 und 80° C liegt, vorzugsweise 40-60°C.
12. Verfahren nach Anspruch 1-11, dadurch gekennzeichnet, daß der Reaktionslösung Reduktionsmittel zugesetzt werden.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß als Reduktionsmittel Natrium-Bisulfit, Natrium-Dithionit, Ascorbinsäure, Thiolverbindungen, Mercaptoverbindungen oder Gluthation eingesetzt werden.
14. Verfahren nach Anspruch 1-13  
dadurch gekennzeichnet, daß als Oxidationsmittel Luft, Sauerstoff, Ozon, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder organische Peroxide eingesetzt werden.
15. Verfahren nach Anspruch 1-14  
dadurch gekennzeichnet, daß Luft oder O<sub>2</sub> bei Normaldruck oder 1 bis 10 bar Überdruck eingesetzt wird.
16. Verfahren nach Anspruch 1-15

- 20 -

dadurch gekennzeichnet, daß  $O_2$  durch  $H_2O_2$  + Katalase oder  $H_2O_2$  durch GOD + Glucose in situ generiert wird.

17. Verfahren nach Anspruch 1 -16

dadurch gekennzeichnet, daß der Reaktionslösung kationenbildende Metallsalze zugesetzt werden.

18. Verfahren nach Anspruch 17

dadurch gekennzeichnet, daß als Kationen  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mn^{3+}$ ,  $Mn^{4+}$ ,  $Cu^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ti^{3+}$ ,  $Ce^{4+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  eingesetzt werden.

19. Verfahren nach Anspruch 1 -18

dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich Komplexbildner der Reaktionslösung zugegeben werden.

20. Verfahren nach Anspruch 19

dadurch gekennzeichnet, daß als Komplexbildner Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) oder Diethylentriamin-penta-essigsäure (DTPA) oder andere Eisen-, Mangan- oder Kupfer-Komplexoren, z. B. Diethylamin, Hydroxylamin, eingesetzt werden.

21. Verfahren nach Anspruch 1 -20

dadurch gekennzeichnet, daß NaOCl eingesetzt wird.

22. Verfahren nach Anspruch 1 -20

dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich Detergentien eingesetzt werden.

23. Verfahren nach Anspruch 22

dadurch gekennzeichnet, daß als Detergentien nicht-ionische, ionische, anionische, kationische und amphotere Tenside zugesetzt werden.

24. Verfahren nach Anspruch 1 -23

dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich Polysaccharide und /oder Proteine der Reaktionslösung zugesetzt werden.

25. Verfahren nach Anspruch 24

dadurch gekennzeichnet, daß als Polysaccharide Glucane, Mannane, Dextrane, Lävane, Pektine, Alginate oder Pflanzengummis und/oder eigene von den Pilzen gebildete oder in der Mischkultur mit hefen produzierte Polysaccharide eingesetzt werden.

26. Verfahren nach Anspruch 24.

dadurch gekennzeichnet, daß als Proteine Gelantine und/oder Albumin eingesetzt werden.

27. Verfahren nach Anspruch 1 -26

dadurch gekennzeichnet, daß als Zusätze Einfachzucker, Oligomerzucker, Aminosäuren, Polyethylenglycole, Polyethylenoxide, Polyethylenimine und Polydimethylsiloxane eingesetzt werden.

28. Verfahren nach Anspruch 1 -27

dadurch gekennzeichnet, daß dem System Radikalbildner oder Radikalfänger zugesetzt werden.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 -28

dadurch gekennzeichnet, daß es zur Delignifizierung oder Bleiche von Zellstoffen zeitlich nach allen bekannten Kochverfahren eingesetzt wird.

30. Verfahren nach Anspruch 29.

dadurch gekennzeichnet, daß als Kochverfahren Sulfat-, Sulfit-, Organosolv-, ASAM-Verfahren, Enabatch-Verfahren u.a. durchgeführt werden.

31. Verfahren nach Anspruch 29.

dadurch gekennzeichnet, daß es nach, zwischen oder vor allen üblichen Bleichstufen und anderen Sequenzen wie Q-Stufe, saurer Wäsche ect. durchgeführt wird.

32. Verfahren nach Anspruch 29-31

dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren in mehreren Stufen durchgeführt wird, wobei zwischen jeder Stufe eine Wäsche oder eine

- 22 -

Wäsche und eine Extraktion mit Lauge oder weder Wäsche noch Extraktion stattfindet.

33. Verfahren nach Anspruch 1-32.

dadurch gekennzeichnet, daß im Konsistenzbereich von 0.5 - 40% gearbeitet wird.

34. Verwendung des Verfahrens nach Anspruch 1 - 33 zur Kohleverflüssigung.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No  
 PCT/EP 94/01966

 A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC 5 D21C3/00 C12S3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 IPC 5 D21C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,92 20857 (CALL) 26 November 1992 see the whole document ---	1-34
A	EP,A,0 429 422 (ENSO-GUTZEIT OY) 29 May 1991 see the whole document ---	1-34
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 8951, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 89-376261 & SE,A,8 800 673 (STONE FILTER CO INC) 27 August 1989 see abstract -----	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "B" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 October 1994

Date of mailing of the international search report

21. 10. 94

Name and mailing address of the ISA

 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Songy, O

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No  
PCT/EP 94/01966

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date	
WO-A-9220857		26-11-92		DE-A-	4137761	19-11-92	
				AU-A-	1793392	30-12-92	
				CA-A-	2103260	18-11-92	
				CN-A-	1068161	20-01-93	
				EP-A-	0584176	02-03-94	
EP-A-0429422		29-05-91		CA-A-	2030186	18-05-91	
				JP-A-	3174078	29-07-91	

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

International Aktenzeichen

PCT/EP 94/01966

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 5 D21C3/00 C12S3/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 5 D21C

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO,A,92 20857 (CALL) 26. November 1992 siehe das ganze Dokument ---	1-34
A	EP,A,0 429 422 (ENSO-GUTZEIT OY) 29. Mai 1991 siehe das ganze Dokument ---	1-34
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 8951, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 89-376261 & SE,A,8 800 673 (STONE FILTER CO INC) 27. August 1989 siehe Zusammenfassung -----	1-6

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"U" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

7. Oktober 1994

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

21. 10.94

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Sony, 0

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, . . . zur selben Patentfamilie gehören

International Aktenzeichen  
PCT/EP 94/01966

		PCT/EP 94/01966	
Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9220857	26-11-92	DE-A- 4137761	19-11-92
		AU-A- 1793392	30-12-92
		CA-A- 2103260	18-11-92
		CN-A- 1068161	20-01-93
		EP-A- 0584176	02-03-94
-----			
EP-A-0429422	29-05-91	CA-A- 2030186	18-05-91
		JP-A- 3174078	29-07-91
-----			